

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/68

G01N 33/96

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01126932.4

[43] 公开日 2002 年 3 月 6 日

[11] 公开号 CN 1338634A

[22] 申请日 2001.9.29 [21] 申请号 01126932.4

[71] 申请人 上海晶泰生物技术有限公司

地址 200233 上海市漕河泾新兴技术开发区桂  
路 69 号 25 号楼 6 楼

[72] 发明人 张 涛 李 宾 彭永济  
李红梅 任一萍

[74] 专利代理机构 上海东亚专利代理有限公司

代理人 董 梅

权利要求书 3 页 说明书 7 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片


[57] 摘要

本发明恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片涉及一种蛋白质芯片,其利用高速全自动点样机器人把多种肿瘤标记物抗体及阳性对照、阴性对照点阵于蛋白芯片的同一腔室内,蛋白质通过化学键连接于固相载体上,所述阳性对照为对应肿瘤标志物,阴性对照为人血清白蛋白。使用本发明不仅可以具有灵敏度高、特异性强、结果稳定、重复性好等优点,而且操作简便、一次即可,既方便了医务工作者,提高了劳动效率,节省国家财力,又使患者在省钱的同时更早诊更 早治,提高治愈率。同时,把相关指标高度集成,能提高判断的准确性,特别利于早期诊断。

ISSN 1000-84274

知识产权出版社出版

BEST AVAILABLE COPY



## 权 利 要 求 书

---

- 1, 一种恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片, 特征在于利用高速全自动点样机器人把多种肿瘤标记物抗体及阳性对照、阴性对照点阵于蛋白芯片的同一腔室内, 蛋白质通过化学键连接于固相载体上, 所述阳性对照为对应肿瘤标志物, 阴性对照为人血清白蛋白。
- 2, 根据权利要求 1 所述的恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片, 特征在于固相载体为活性基团修饰的玻璃片。
- 3, 根据权利要求 1、2 所述的恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片, 特征在于所述阳性对照是指最普遍存在的众多恶性肿瘤的肿瘤标记物的抗体。
- 4, 根据权利要求 1、2 所述的恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片, 特征在于所述阳性对照是指按人体器官分类, 每一类分别点上一种器官常发的恶性肿瘤对应的肿瘤标记物的抗体。
- 5, 根据权利要求 1、2 所述的恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片, 特征在于将病人血清滴加于芯片表面, 血清中的肿瘤标志物分别与固定在芯片上的相应抗体结合, 洗去未结合的其他物质后, 加入荧光标记的抗肿瘤标记物抗体混合物, 反应后洗去未结合者, 样品点的荧光强度与血清中的肿瘤标记物的含量成正相关。
- 6, 根据权利要求 1、2 所述的恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片, 特征在于将病人血清滴加于芯片表面, 血清中的肿瘤标志物分别与固定在芯片上的相应抗体结合, 洗去未结合的其他物质后, 在血清反应



后，加入生物素标记的抗肿瘤标记物抗体混合物，反应后洗去未结合物，再加入荧光标记的亲合素/链亲合素，反应后洗去未结合者，点样点的荧光强度与血清中的肿瘤标志物的含量呈正相关。


7, 恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片的制备方法，特征在于第一步点样，是根据样品数量设计适当的阵列排布，使用高速全自动点样机器人把多种肿瘤标记物抗体及阳性对照物、阴性对照点阵于蛋白芯片的同一腔室内；其后，在常温条件下过夜，使蛋白质的氨基与玻璃片上的醛基发生缩合反应，以固定样品；再后，利用制作蛋白芯片的常规方法进行封闭、洗涤、干燥、包装、保存。

8, 恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片的检测方法，特征在于，(1) 在点好的蛋白芯片上滴加待检血清，37℃孵育 1 小时；(2) 用低浓度钠盐洗去多余样品；(3) 加封闭液进行封闭，再次洗脱并晾干；(4) 滴加封闭液稀释过的荧光标记的多种肿瘤标记物抗体混合物，37℃孵育半小时后洗去未结合物并晾干；(5) 反应结束后，利用专业的芯片扫描分析仪进行结果的判读和分析。

9, 恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片的检测方法，特征在于，(1) 在点好的蛋白芯片上滴加待检血清，37℃孵育 1 小时；(2) 用低浓度钠盐洗去多余样品；(3) 加封闭液进行封闭，再次洗脱并晾干；(4) 滴加封闭液稀释过的以生物素标记的肿瘤标记物抗体混合物，37℃孵育半小时后洗去未结合物并晾干；(5) 滴加封闭液稀释过的荧光标记亲合素/链亲合素，37℃孵育半小时后洗去未结合物并晾干；

01.10.10

(6) 反应结束后，利用专业的芯片扫描分析仪进行结果的判读和分析。



## 说明书

---

### 恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片

#### 技术领域

本发明恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片涉及一种蛋白质芯片，蛋白质芯片技术是将蛋白或多肽有序地点阵在固体片基上，利用免疫学方法对蛋白质进行检测、识别、鉴定的新兴技术。具有体积小，信息含量高、并可依不同需要进行组合设计等特点。

#### 背景技术

近年来，恶性肿瘤已成为危害人类健康的常见病，多发病。它不仅对患者生命造成威胁，且治疗费用高昂。但是恶性肿瘤并非不治之症，只要及早发现，尽早治疗，治愈率可达 90%以上，尽早治疗的费用也相对极其低廉。所以目前世界许多科学工作者都致力于恶性肿瘤早期诊断工作。

现有临床进行恶性肿瘤早期诊断的方法分为两类：一，免疫学检测；二，分子生物学检测。免疫学检测包括：1，酶免技术；2，荧光免疫检测；3，放射免疫检测；4，免疫细胞化学检测。分子生物学检测主要是指基因诊断技术。

目前临床常用的免疫学方法检测试剂盒多是多种肿瘤标志物。其中，肿瘤标志物是肿瘤组织产生或机体对肿瘤组织的反应而产生




的物质的逐一检测，存在操作复杂、重复、费时、费力、费钱等缺点。然而，最近新出的肿瘤特异性生长因子（Tumor Specific Growth Factor, TSGF）试剂盒在早早癌诊断上有一定作用，但其最大的缺点是不能检测出到底是哪个部位发生了恶性肿瘤，需借助超声波、核磁共振等物理方法或用其他有器官特异性肿瘤标志物配合检测以确定病变部位。而分子生物学检测需聚合酶链反应（PCR）等烦复操作，且 PCR 容易产生假阳性，是一种不可靠的方法。

### 发明内容

本发明的目的在于：提供一种通过一次检测，既可检出被检者体内是否存在恶性肿瘤，而且可以直接判定肿瘤到底发生于患体内哪个部位的恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片。

本发明的目的可通过下述技术方案实现：本发明利用高速全自动点样机器人把多种肿瘤标记物抗体及阳性对照（对应肿瘤标志物）、阴性对照（人血清白蛋白）点阵于蛋白芯片的同一腔室内，蛋白质通过化学键连接于固相载体上固定。本发明固相载体如活性基团修饰的玻璃片等。

在上述方案基础上，多种肿瘤标记物抗体能特异结合最普遍存在于众多恶性肿瘤中的肿瘤标志物，将其以及阳性对照点在一个芯片上制成普通型恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片，应用于体检普查，通过一次检测，既可检出被检者体内是否存在恶性肿瘤，而且可以



直接判定肿瘤到底发生于患体内的哪个部位。

在上述方案基础上，多种肿瘤标记物抗体是按人体器官分类，每一类分别点上一种器官常发的恶性肿瘤对应的肿瘤标记物的抗体，制成临床检测型恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片，可以依据临床需要按病人不适部位进行，也是一次检测即可达到检测目的。

本发明用于检测病人血清中的肿瘤标志物，是将病人血清滴加于芯片表面，血清中的肿瘤标志物分别与固定在芯片上的相应抗体结合，洗去未结合的其他物质后，按设计一，加入荧光标记的抗肿瘤标记物抗体混合物，反应后洗去未结合者，样品点的荧光强度与血清中的肿瘤标记物的含量成正相关，如图 1 双抗体夹心法原理图所示。

本发明用于检测病人血清中的肿瘤标志物，按设计二，可在血清反应后，加入生物素标记的抗肿瘤标记物抗体混合物，反应后洗去未结合物，再加入荧光标记的亲合素链亲合素，反应后洗去未结合者，点样点的荧光强度与血清中的肿瘤标志物的含量呈正相关。设计二与设计一相比，设计二具有信号放大作用，提高了检测灵敏度。如图 2 引入生物素放大系统的原理图所示。

本发明制备方法：第一步点样、制作技术：（1）根据样品数量设计适当的阵列排布，使用高速全自动点样机器人把多种肿瘤标记物抗体 1 及阳性对照物（对应肿瘤标志物）、阴性对照（人血清蛋白）点阵于蛋白芯片的同一腔室内；（2）室温常温（25℃左右）过夜，

使蛋白质的氨基与玻璃片上的醛基发生缩合反应，以固定样品；（3）利用制作蛋白芯片的常规方法进行封闭、洗涤、干燥、包装、保存。

本发明的杂交反应有下述二种方法：

方法一（1）在点好的蛋白芯片上滴加待检血清，37℃孵育 1 小时；（2）用低浓度钠盐洗去多余样品；（3）加封闭液进行封闭，再次洗脱并晾干；（4）滴加封闭液稀释过的荧光标记的多种肿瘤标记物抗体 2 混合物，37℃摄氏度孵育半小时后洗去未结合物并晾干。

方法二：（1）在点好的蛋白芯片上滴加待检血清，37 摄氏度孵育 1 小时。（2）用低浓度钠盐洗去多余样品。（3）加封闭液进行封闭，再次洗脱并晾干。（4）滴加封闭液稀释过的以生物素标记的肿瘤标记物抗体 2 混合物，37 摄氏度孵育半小时后洗去未结合物并晾干。（5）滴加封闭液稀释过的荧光标记亲和素/链亲和素，37 摄氏度孵育半小时后洗去未结合物并晾干。

结果检测：反应结束后，利用专业的芯片扫描分析仪进行结果的判读和分析。

本发明的优越性在于：使用本发明不仅可以具有灵敏度高、特异性强、结果稳定、重复性好等优点，而且操作简便、一次即可，既方便了医务工作者，提高了劳动效率，节省国家财力，又使患者在省钱的同时更早诊更早治，提高治愈率。同时，把相关指标高度集成，能提高判断的准确性，特别利于早期诊断。



### 附图说明

附图 1, 双抗体夹心法原理图。

附图 2, 引入生物素放大系统的原理图。

附图 3, 肝癌诊断蛋白质芯片。

附图 4, 胰腺癌诊断芯片。

### 具体实施方式

实施例一, 如图 3 一种肝癌诊断蛋白质芯片所示, 其中,

A1: 抗甲胎蛋白 (AFP) 抗体

A2: 抗  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶同工酶 ( $\gamma$ -GT) I', II, II' 抗体

A3: 抗异常凝血酶原 (DPC) 抗体

A4: 抗  $\alpha$ -L 岩藻糖苷酶抗体

B1: 抗 5'-核苷酸磷酸二酯酶同工酶 V、VI 抗体

B2: 抗胎盘型谷胱甘肽 S 转移酶抗体

B3: 抗  $\alpha$ 1-抗糜蛋白酶抗体

B4: 抗铁蛋白抗体

C1: 抗酸性同工铁蛋白抗体

C2: 抗乙肝表面抗原抗体

C3: 丙型肝炎抗原

D1: 阳性对照

D2: 阴性对照

迄今为止，AFP 仍是诊断肝癌的主要实验指标。但是部分良性肝病、生殖系统畸胎瘤和胃肠道的一些恶性肿瘤 AFP 也可升高，而另一些肝细胞癌患者 AFP 始终持续是低浓度，检出困难。我们用：1、抗人 LCA（小扁豆凝集素）结合型 AFP 单克隆抗体；2、抗人伴刀豆球蛋白（ConA）结合型 AFP 抗体；3、抗人 AFP 抗体点样。抗人 LCA（小扁豆凝集素）结合型 AFP 单克隆抗体，使低浓度 AFP 或小肝癌的阳性检出率由传统方法的 33.3% 提高到 86.7%，假阳性率仅 1.2%。因为原发性肝癌以 ConA 结合型 AFP 为主，ConA 非结合型 AFP 仅占少数，而继发性肝癌和生殖系统畸胎瘤则正好相反， $\gamma$ -GT I'，II，II' 仅见于肝癌患者，所以伴刀豆球蛋白（ConA）结合型 AFP 抗体、抗人 AFP 抗体和抗（ $\gamma$ -GT）I'，II，II' 抗体点样即可达到区分它们的目的。当 AFP < 400ng/ml，DPC 的阳性率达 57%，且 DPC 用于肝癌诊断具有高度的特异性。AFP 阴性的肝癌， $\gamma$ -GT II' 的阳性率为 84.6%。

同样道理，其他多种指标也是按照上述多种指标相互取长补短而设计点样的。如此设计方便医生综合考虑，真正做到一次验血即可确诊。

实施例二，如图 4 胰腺癌诊断芯片所示，

A1: 抗 CA19-9 抗体

A2: 抗 CA242 抗体

A3: 抗 CA50 抗体

B1: 抗 CA72-4 抗体

B2: 抗 CA125 抗体

B3: 抗组织合成肽抗原抗体

C1: 抗癌胚抗原 (CEA) 抗体

C2: 抗肽癌胚抗原 (POA) 抗体

C3: 抗半乳糖苷转移酶同工酶 II (GalT II) 抗体

D1: 阳性对照

D2: 阴性对照

同上述制作方法, 可设计出其他器官的临床检测型恶性肿瘤诊断蛋白芯片。

实施例三, 普查型恶性肿瘤早期诊断的蛋白芯片, 系将两种或两种以上临床检测型恶性肿瘤诊断蛋白芯片的已知指标组合在一起即成。

# 说明书附图

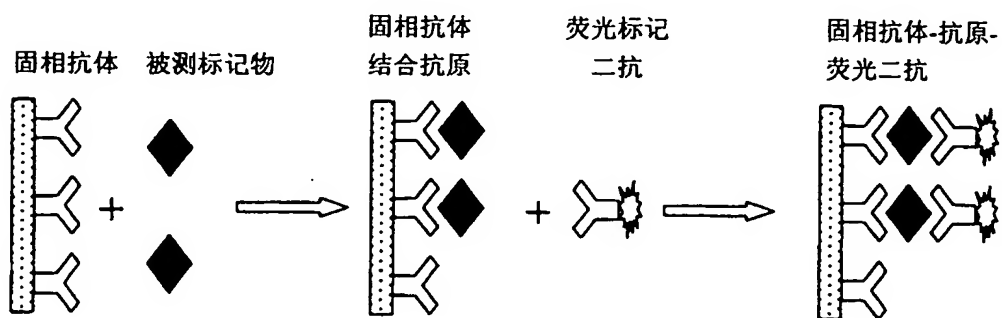


图 1

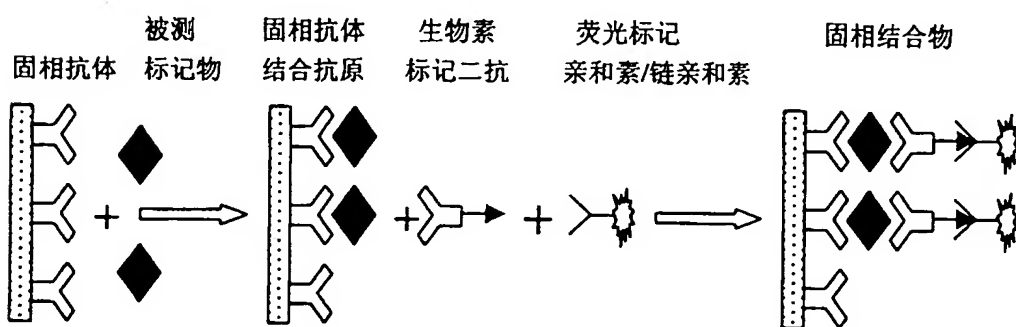


图 2

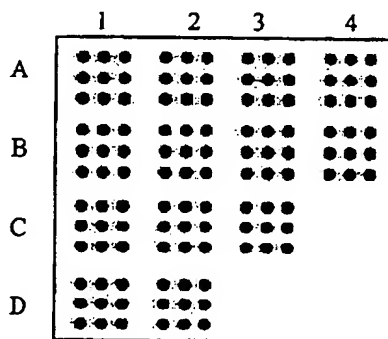


图 3

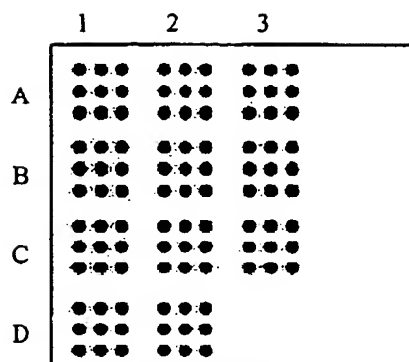


图 4